Über den Cystinstoffwechsel und die quantitative Bestimmung des Cystins im Harn

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät der Universität Basel

von

MAX TSCHAMPER

von Strengelbach (Kanton Aargau)

BUCHDRUCKEREI KARL SCHAHL
STETTEN/BASEL 1933

Genehmigt

von der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

auf Antrag von Herrn Prof. GERLACH

Tag der Promotion: 13. Juli 1932

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

(Aus der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel.)
Vorsteher: Prof. Karl Spiro

Über den Cystinstoffwechsel und die quantitative Bestimmung des Cystins im Harn.

I.

In der Stoffwechsellehre ist dem Schwefel besonders als einem Bestandteil fast aller Eiweißkörper Beachtung geschenkt worden. Bei der Säure- und Alkalihydrolyse, sowie beim enzymatischen Abbau verschiedener Eiweisse, vorwiegend der Keratine, wurde das Cystin als die hauptsächliche schwefelhaltige Aminosäure isoliert. So fand K. A. H. Mörner (1) beispielsweise bei der Hydrolyse von Rinderhorn 6—6,8 %, in Menschenhaaren 11,3—13,92 % Cystin; kristallisiertes Serumalbumin ergab nach demselben Autor 2,53 % Cystin, Serumglobulin 1,51 % und Eieralbumin 0,30 % Cystin. Es sei aber bemerkt, daß diese Zahlen, sofern sie mit derselben Methode gefunden wurden, nur eine vergleichende Übersicht über den Cystingehalt der verschiedenen Proteine und Proteinoide (Gerüsteiweißstoffe) gestatten, da bei der angewandten, ziemlich schonungslosen, Hydrolyse beträchtliche Mengen Cystin zerstört werden und so der Bestimmung entgehen. In neueren Untersuchungen wurden daher auch von den oben angeführten Zahlen zum Teil erheblich abweichende Werte gefunden, so gibt Sullivan (2) für Serumalbumin einen Cystingehalt von 5,71 % an.

Mit Hilfe der Natriumnitroprussid-Reaktion, sowie mittels der Molybdänblaubildung aus sechswertigem Molybdän, konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß die Eiweißkörper neben dem Cystin auch vielfach die reduzierte Form desselben, das Cystein,

präformiert enthalten (vgl. K. Spiro, 3); Denaturierung bestimmter Eiweisse ruft eine verstärkte Reaktion auf die im Cysteinmolekül enthaltene Sulfhydrylgruppe (–SH) hervor. Manche Eiweißstoffe ergeben eine positive Reaktion auf die SH-Gruppe überhaupt erst nach ihrer Denaturierung, was auf die wichtige Tatsache hinweist, daß bei der Denaturierung eine Verschiebung in den Bindungsverhältnissen des Schwefels innerhalb des Eiweißmoleküls stattfindet (Hopkins).

Der Schwefelgehalt vieler Proteine, besonders solcher tierischer Herkunft, deckt sich nicht vollkommen mit ihrem Cystingehalt, so daß noch auf andere schwefelhaltige Eiweißbausteine zu schließen ist. Diese Verhältnisse sind jedoch noch nicht vollkommen geklärt. Neuerdings wurde von J. H. Müller (4) aus Casein, ferner von S. Velake (5) aus dem Autolysat der Hefe eine weitere schwefelhaltige Aminosäure, Methionin (Aminomethyl-thiobuttersäure) dargestellt. Vermutlich kommt auch ein Imidazolderivat, Thiohistidin, sowie das Methylderivat desselben, das Ergothionin, als Schwefelquelle einiger Eiweißkörper in Betracht.

Bei Fütterungsversuchen mit einem vollwertigen Aminosäurengemisch darf das Cystin nicht fehlen. Als ein Bestandteil des Protoplasmas der Zellen ist es für den Organismus unentbehrlich. Der Schwefel von per os eingeführtem Cystin wird zum größten Teil bis zu Schwefelsäure oxydiert ausgeschieden, daneben tritt auch eine entsprechende Erhöhung des Gehalts an Nicht-Sulfatschwefel im Harne auf. Bei Verfütterung von Cystin in wässriger Suspension an Kaninchen tritt eine Verschiebung des Verhältnisses von Sulfatschwefel zu dem nichtoxydierten Schwefel des Kaninchenharnes von normalerweise 1:4 auf 1:1,2 ein (6); gegenüber dem sogenannten „Neutralschwefel" erscheint also das Sulfat in beträchtlich vermehrter Menge. Von großem Interesse ist ein Umwandlungsprodukt des Cystins, bezw. des Cysteins, das Taurin. Es entsteht aus dem Cystein durch Decarboxylierung und Oxydation der Thiolgruppe zu der Sulfosäureverbindung. Nach G. v. Bergmann (7) steigert gleichzeitige Verfütterung von Cystin und cholsaurem Natrium an Hunden die Ausscheidung von Taurocholsäure mit der Galle während etwa 24 Stunden auf über das Doppelte der sonst durchschnittlich ausgeschiedenen Menge. H. D. Dakin (7a) fand bei Verfütterung von Cystein an Hunden mit Glykosurie die Bildung vermehrter Glukosemengen.

Dem Cystin-Cystein-Komplex kommt im intermediären Stoffwechsel noch in mancher anderen Hinsicht große Bedeutung zu. Eine wesentliche Rolle spielt das Cystin bei dem Aufbau des Insulin, das den größten Teil des Schwefels in Form dieser Aminosäure enthält (Sullivan). Diese Feststellung läßt den Zusammenhang zwischen der Beeinflußbarkeit des Kohlehydratstoffwechsels durch Zuführung elementaren Schwefels (E. Földes, 8) (der Blutzuckergehalt wird dadurch bei normalen Kaninchen herabgesetzt) und der Cystinkomponente des Insulins erkennen.

F. G. Hopkins (9) isolierte 1921 aus Hefe und dann auch aus zahlreichen Geweben ein schwefelhaltiges Tripeptid, das Glutathion. In seiner Zusammensetzung besteht das Glutathion aus einem Glutaminsäure-, Cystein- und Glykokollrest, die untereinander säureamidartig gebunden sind. Oxydation des Glutathions liefert die dem Cystin entsprechende Disulfidverbindung. Nachdem T. Thurnberg (10) bereits 1920 die Sauerstoff übertragende Rolle des Cystein-Cystin-Systems hervorgehoben und ihm die Wirkung eines „Atmungsenzyms" zugeschrieben hatte und weiterhin O. Meyerhof (11) die Funktion verschiedener Sulfhydrylkörper (Thioglykolsäure, Thiomilchsäure) für die Gewebsatmung experimentell erwiesen hatte, konnte dem Glutathion für den Atmungsvorgang eine wesentliche Bedeutung zuerkannt werden. Diese Annahme findet sich in zahlreichen Arbeiten der letzten Jahre bestätigt. Es sei noch erwähnt, daß die Sulfhydrylkörper von der Art des Cysteins und Glutathions (in der reduzierten Form) auch als Aktivatoren proteolytischer Fermente von Bedeutung sind (Graßmann und Mitarbeiter, 12). Die reduzierende Wirkung der Gewebe beruht vorwiegend auf ihrem Gehalt an Sulfhydrylverbindungen (Glutathion, Ergothionein), so z. B. die Reduktion elementaren Schwefels bei der Resorption zu Schwefelwasserstoff (C. Moncorps, 13), oder auch die Überführung dreiwertigen Eisens in die für die Resorption geeignete zweiwertige Stufe durch die Sulfhydrylverbindungen der Darmschleimhaut.

C. Vögtlin (14) fand 1924, daß die Vergiftung von Ratten mit arseniger Säure durch Glutathion behoben werden kann. Diese Erscheinung wurde auch von R. Labes (15) bei Versuchen mit Cystein beobachtet. Der SH-Gruppe scheint mithin eine entgiftende Wirkung zuzukommen. Die bei Zufuhr von Halogenbenzol im Körper sich bildende und im Harn auftretende

Mercaptursäure, bei der an der Thiolgruppe des Cysteins das Halogenbenzol substituiert und die Aminogruppe acetyliert ist, stellt ebenfalls einen Entgiftungsvorgang dar, an dem das Cystein beteiligt ist. Der Übergang von Blausäure und Nitrilen in Rhodanverbindungen, wobei das Cystin und Cystein hauptsächlich als Schwefelquelle in Betracht kommen, zeigt in gleicher Weise die entgiftende Wirkung, und somit eine wichtige physiologische Funktion dieser Aminosäuren.

Mit dem Schicksal des Cystinschwefels im Organismus haben sich zahlreiche Arbeiten beschäftigt. Wie bereits erwähnt, tritt bei Cystinverfütterung sowohl eine Erhöhung des Sulfatschwefels, als auch des Gehaltes an nichtoxydiertem Schwefel im Harn auf, hierbei sind jedoch große individuelle Verschiedenheiten im Cystinabbau bei den Versuchsobjekten zu beobachten. Normalerweise erfolgt ein weitgehender Abbau des Cystins im Organismus. Es ist jedoch von großem Interesse, daß auch im normalen Harn häufig geringe Mengen Cystin gefunden wurden. (Looney, Berglund und Graves, 16). So beobachtete Abderhalden (17) Cystinmengen von 0,2—7,2 mg in 100 ccm normalem Harn, eine Angabe, die ich in eigenen, unten mitzuteilenden Untersuchungen in befriedigend übereinstimmender Weise bestätigen kann. Daß frühere Untersucher im Harn von Stoffwechselgesunden kein Cystin fanden, mag zu einem Teil an der angewandten Methodik zur Abscheidung des Cystins aus dem Harn liegen, wobei die Löslichkeit des Cystins im Urin (in nativ-saurem Urin lösen sich etwa 50 mg%) und den zur Abscheidung verwendeten Reagentien als Fehlerquelle in Betracht kommt. Nach den bis jetzt vorliegenden Untersuchungen muß die Frage, ob das Cystin als ein normaler Harnbestandteil anzusehen ist, noch offen gelassen werden.

Die bekannte Tatsache, daß benzoylierte Aminosäuren durch die Niere unverändert ausgeschieden werden (A. Magnus-Levy 18), also die „Blockierung" der Aminogruppe durch den Benzoylrest die Aminosäure vor weiterem Abbau im Organismus schützt, ist auch für die Angreifbarkeit der Schwefelgruppe in Cystinderivaten von Wichtigkeit. In Versuchen an Kaninchen zeigten H. B. Lewis und Mitarbeiter (19), daß die Besetzung der Aminogruppe im Cystin den Schwefel in gewisser Weise vor der Oxydation im Tierkörper schützt. Nach oraler Verabreichung von Cystin, an dessen Aminogruppe Phenyl-isocyanat an-

gelagert war, wurde dasselbe als Phenyl-uraminocystin (also unverändert) durch die Nieren ausgeschieden. Ein Teil des Phenyluraminocystins kann im Körper zu Phenyluraminocystein reduziert werden. Nach Injektion von Dibenzoylcystin wird der Schwefel von Kaninchen zum größten Teil in nichtoxydierter Form ausgeschieden. Die Anlagerung der Benzoylreste an die Aminogruppen des Cystins verhindert also die Oxydation des Schwefels im Tierkörper.

Das Auftreten von Cystin im Harn bei Vorliegen einer Stoffwechselanomalie, der Cystinurie, ist ja schon lange bekannt. Vielfach konnte diese Anomalie des Stoffwechsels als vererbbar erwiesen werden, sodaß man von einer vererbbaren Disposition zu der Cystinurie sprechen kann. E. Abderhalden (20) spricht die Cystinurie als eine Dysfunktion des Eiweißabbaues an; sicherlich spielt hierbei eine allgemeine Verlangsamung des Stoffwechsels, insbesondere der Oxydationsprozesse, eine Rolle. Auch der Abbau anderer Aminosäuren wie Lysin, Leuzin, Tyrosin, Asparaginsäure ist in manchen Fällen beim Cystinuriker gestört, da diese Stoffe häufig neben Diaminen (Putrescin, Kadaverin) bei Cystinurie im Harn angetroffen werden (21). Zugeführtes Cystin vermag aber auffallenderweise auch der Cystinuriker umzusetzen; das ausgeschiedene Cystin muß also — da eine Cystinsynthese im Organismus nicht beobachtet wurde — der aufgenommenen Nahrung, vor allem dem Eiweiß derselben, entstammen. Der Genuß von Leguminosen, Fischen und Austern verursacht bei Cystinurie eine Steigerung der Cystinausfuhr. Die bei Cystinurie ausgeschiedene Cystinmenge beträgt nach L. V. Udránszky und E. Baumann (22) etwa 1 Gramm im Tagesharn.

II.

Besonders die in der vorstehenden Übersicht über den Cystinstoffwechsel kurz angedeutete Entdeckung, daß dem Sulfhydryl-Disulfidsystem eine wichtige physiologische Funktion bei den biologischen Oxydationsprozessen zukommt, hat das Studium des Schwefelstoffwechsels, vornehmlich den Stoffwechsel der hier in Betracht kommenden schwefelhaltigen Verbindungen, Cystin/Cystein, Glutathion (–SH u. –S–S–), Ergothionein (–SH u. –S–S–) erneut angeregt. Der Schwefelgruppe in diesen genannten Verbindungen kommen gewisse Reaktionen gemeinsam zu, die für

eine quantitative Bestimmung derselben ausgenützt werden können. So sind in den letzten Jahren mit Hilfe verschiedener Methoden zahlreiche Untersuchungen über den Gehalt an diesen Schwefelverbindungen im Blut und in den Geweben ausgeführt worden (23, 24, 25).

Für die Bestimmung der Sulfhydrylkörper in Blut und Gewebe kommt hauptsächlich die Jodtitration in Betracht. Die eiweißfreien Blut- und Gewebsfiltrate sollen angeblich keine anderen reduzierenden Substanzen als die zu bestimmenden SH-Systeme enthalten (24). Es muß jedoch als wahrscheinlich angesehen werden, daß besonders beim Arbeiten mit Organen in der enteiweißten Lösung sich neben den reduzierenden Schwefelverbindungen andere Jod-addierende Stoffe, wie Lipoide usw., vorhanden sind. Dafür spricht, daß Lösungen, die mit Nitroprussidnatrium keine für die SH-Gruppe charakteristische Farbreaktion geben, häufig einen Jodverbrauch zeigen. Die Oxydation der SH-Gruppe mittels Jod verläuft nach zwei Richtungen: einmal, und zur Hauptsache, erfolgt Oxydation von 2 Molekülen der SH-Verbindung zu der Disulfidform, daneben verläuft eine zweite Reaktion, indem die Sulfhydrylgruppe unter Verbrauch von 6 Atomen Jod in die Sulfosäuregruppe ($-SO_3H$) übergeht. Diese letzte Reaktion ist von der Verdünnung abhängig, ferner von dem Gehalt der Lösung an Kaliumjodid. Bei der Jodtitration sind deshalb besondere Vorsichtsmaßregeln zu beachten. Von zahlreichen Untersuchern konnten mit Hilfe dieser Methode gut übereinstimmende Werte erzielt werden. Für die Bestimmung des Cystins im Harn kommt die Jodmethode nicht in Frage.

Aus Erwägungen, die mit dem im ersten Teil dieser Arbeit kurz geschilderten Stoffwechsel von Cystin und Cystinderivaten in Zusammenhang stehen, wurde im hiesigen Institute nach einer brauchbaren Methode für die Cystinbestimmung im Harn gesucht. In der Literatur sind einige für den Harn ausgearbeitete Methoden angegeben. Da sie sich aber zu einem Teil als zu umständlich, vor allem aber zur Erfassung kleiner Mengen Cystin als ungeeignet, oder aber zu einem anderen Teil bei der Nachprüfung als fehlerhaft erwiesen, bin ich einer Anregung von Herrn Prof. Spiro gefolgt, eine geeignete Mikromethode zur Bestimmung des Cystins im Harn auszuarbeiten.

Die vornehmlich in der älteren Literatur aufgeführten Methoden geben eine direkte Abscheidung des Cystins aus dem Harn

an, entweder als solches, oder aber in Form schwerlöslicher Verbindungen. Es sei hier die Bestimmung des Cystins als Benzoylcystin nach v. Udránszky und Baumann (26) erwähnt; allerdings fanden die Autoren von 0,476 Gramm Cystin, 1 Liter Harn zugesetzt, nur 40% als Benzoylcystin wieder. Dieses Verfahren wurde von B. Mester (27) verbessert, sodaß rund 90% der berechneten Cystinmenge wiedergefunden wurden. J. F. Gaskell (28) scheidet vorhandenes Cystin aus dem Harn (nach vorausgehender Ausfällung der Phosphate und Oxalate) mittels Azeton und Essigsäure ab. Der Urin muß zur vollkommenen Ausfällung des Cystins 3—4 Tage stehen. Die Fällung wird in Ammoniak wieder gelöst und erneut mit Azeton und Essigsäure gefällt. Nach Trocknung bei 80 Grad erfolgt Wägung des Niederschlages. Gaskell fand auf diese Weise 93—96% des dem Harn zugesetzten Cystins wieder.

Die aufgeführten Methoden lassen eine große Unsicherheit der Cystinbestimmung im Harn erkennen. Für die Ausgestaltung zu einer klinisch brauchbaren Mikromethode boten sie wenig Anknüpfungspunkte. Hingegen erschien eine von Looney (29) angegebene kolorimetrische Methode für den gesuchten Zweck geeignet zu sein. Diese Methode beruht auf der Reduktion des Cystins zu Cystein mit Natriumsulfit; das gebildete Cystein gibt mit Phosphorwolframsäure eine Blaufärbung, die kolorimetrisch mit Hilfe einer Cysteinstandardlösung bestimmt wird. Diese Methode erwies sich in meinen Versuchen ebenso wie bereits in früheren von K. Spiro (3) jedoch als fehlerhaft, da das zur Reduktion des Cystins verwendete Natriumsulfit ebenfalls eine Blaufärbung mit Phosphorwolframsäure gibt, und so schon im Leerversuch ein Cystingehalt vorgetäuscht wird.

Die Kolorimetrie erscheint als die handlichste Form der Cystinbestimmung. Die bekannten Farbreaktionen werden nicht vom Cystin, sondern von dessen Reduktionsstufe, dem Cystein, gegeben. Es seien hier folgende Farbreaktionen erwähnt: die Rotfärbung des Cysteins in alkalischer Lösung mit Natriumnitroprussid, die Bildung von Molybdän- bezw. Wolframblau aus den Heteropolysäuren (Phosphormolybdänsäure bezw. -Wolframsäure, ferner die Reaktion mit -Naphtochinonsulfosäure nach Sullivan. Diese letzte Farbreaktion wird nur von den Sulfhydryl-Verbindungen gegeben, die benachbart der SH-Gruppe eine NH_2-Gruppe enthalten; Glutathion gibt diese Reaktion nicht. Die Natrium-

nitroprussid-Reaktion, die verschiedentlich zur quantitativen Bestimmung des Cystins ausgenützt worden ist, fällt für die Cystinbestimmung im Harn weg, da der Harn bekanntlich noch andere Substanzen enthält, die mit dem Reagens Färbungen geben. Der native Harn gibt infolge seines Gehaltes an reduzierenden Substanzen, wie Harnsäure, Farbstoffen usw. bereits eine Blaufärbung mit Phosphormolybdänsäure. Soll daher diese Reaktion zur Bestimmung des Cystins im Harn verwendet werden, so muß das Cystin entweder von den anderen reduzierenden Substanzen abgetrennt werden, oder aber es muß — wie bei der erwähnten Methode von Looney — die Farbvertiefung des mit einer Heteropolyverbindung versetzten Harns nach erfolgter Reduktion des Cystins bestimmt werden.

Für meine Versuche über die Cystinbestimmung im Harn habe ich die Molybdänblaubildung aus Phosphormolybdänsäure durch Cystein benutzt. Mein Hauptaugenmerk hatte ich dabei auf die Wahl eines geeigneten Reduktionsmittels zu lenken. Da, wie erwähnt, das dem Harn zugesetzte Natriumsulfit bereits für sich eine Blaufärbung mit Phosphormolybdänsäure gibt, kann diese Verbindung als Reduktionsmittel nicht mehr in Betracht kommen.

In den folgenden Untersuchungen habe ich zwei Reduktionsmittel, Natriumcyanid und Zink auf ihre Brauchbarkeit für die Cystinüberführung in Cystein geprüft und daraufhin zu einer quantitativen Methode der Cystinbestimmung im Harn zu gelangen versucht.

Es seien zunächst die Versuche mit Natriumcyanid als Reduktionsmittel beschrieben.

In alkalischer Lösung vermag Natriumcyanid Cystin zu Cystein zu reduzieren.

$$\underset{\text{Cystin}}{-\,S.S-} + NaCN + H_2O = \underset{\text{Cystein}}{2 - SH} + NaCNO$$

Diese Reaktion wurde bereits von Kühnau (24) bei seiner jodometrischen Methode für die Bestimmung des Gesamtglutathions in Organen benutzt. Für die kolorimetrische Cystinbestimmung im Harn ergibt sich folgender Arbeitsgang: Reduktion des Cystins mit NaCN in ammoniakalischer Lösung, kolorimetrische Bestimmung des gebildeten Cysteins.

Hier sei eingeschaltet, daß ich für meine sämtlichen Versuche nicht ein einfaches Kolorimeter, sondern das Pulfrich'sche

Stufenphotometer benutzt habe. Mit Hilfe dieses Instrumentes mißt man in einem geeigneten Spektralbezirke direkt die von einer Farblösung absorbierte Lichtmenge in Prozenten des eingetretenen Lichtquantums. Das Meßresultat läßt sich in Abhängigkeit von der Farbkonzentration in bequemer Weise darstellen, wenn man aus der absorbierten bezw. der durchgelassenen Lichtmenge den Extinktionskoeffizienten, d. i. den negativen Logarithmus der Lichtdurchlässigkeit bezogen auf eine Schichtdicke der Farblösung von 1 cm, errechnet. Bei Gültigkeit des bekannten Lambert-Beer'schen Gesetzes ist der Extinktionskoeffizient der Farbstoffkonzentration und auch der zur Messung benutzten Schichtdicke direkt proportional. Für die Handhabung des Stufenphotometers möchte ich im übrigen auf die Originalarbeiten von C. Pulfrich (30) verweisen. Die Messung der blauen Reaktionsfarbe im Stufenphotometer geschieht zweckmäßig im roten Spektralbezirk, da hier die blaue Farblösung ein Absorptionsmaximum zeigt. Als geeignet erwiesen sich die Spektralfilter „S61" und „S72"; wegen der größeren Empfindlichkeit für das menschliche Auge habe ich vorwiegend das erstere Filter verwendet. Das Stufenphotometer hat den großen Vorzug, nach einmal erfolgter Eichung mit den betr. Standardlösungen bei weiteren Messungen jede Vergleichslösungen überflüssig zu machen. Cystinlösungen sind nur beschränkt haltbar, sie müssen daher gewöhnlich für jeden Versuch neu angefertigt werden. Zudem ist reines Cystin ziemlich teuer. Die Ersparung einer Standardlösung muß daher bei der Cystinbestimmung mittels des Stufenphotometers, abgesehen von der Zeitersparnis, besonders angenehm empfunden werden.

Anhand reiner Cysteinlösungen abgestufter Konzentrationen, habe ich mich von der Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes für den vorliegenden Fall überzeugt, d. h. die Molybdänblaubildung ist den angewandten Cysteinkonzentrationen proportional. Folgende Zahlen geben die Verhältnisse wieder:

Cystein-HCl mg in 100 ccm	D/2 cm	K	Filter
0,131	63,83	0,19499	S 61
0,262	40,3	0,3947	S 61
0,393	26,16	0,5834	S 61
0,524	16,58	0,7804	S 61

D bedeutet den negativen Logarithmus der Lichtdurchlässigkeit für die benutzte Schichtdicke, K den aus D errechneten Extinktionskoeffizienten. Wie ersichtlich, ist K mit genügender Genauigkeit den angewandten Cysteinkonzentrationen proportional.

Die Reduktion des Cystins mit NaCN erfolgt in ammoniakalischer Lösung. Da die Phosphormolybdänsäure ebenso wie das Molybdänblau durch hohe Alkalikonzentrationen zerstört werden, wird die Reaktionslösung nach erfolgter Reduktion und vor dem Zusatz von Phosphormolybdänsäure mit HCl wieder angesäuert und nach dem Zusatz von Molybdänsäure die für die Molybdänblaubildung optimale Reaktion mit Na-Acetat und Na_2CO_3 hergestellt. Die Versuchsanordnung ergibt sich aus folgendem Schema:

A	B	C
0,5 ccm	1,0 ccm	1,5 ccm
Cystinlösung 0,2%ig	Cystinlösung 0,2%ig	Cystinlösung 0,2%ig
1 ccm NaCN 5 „	1 ccm NaCN 5 „	1 ccm NaCN 5 „
2 ccm NH_3 25 „	2 ccm NH_3 25 „	2 ccm NH_3 25 „

Die Lösungen werden 10 Minuten im kochenden Wasserbad erwärmt, danach 1 ccm HCl 25%ig zugegeben (diese Säuremenge genügte zum Ansäuern, da ein Teil des Ammoniaks beim Erhitzen flüchtig geht), 2 ccm 5%ige Phosphormolybdänsäure und darauf mit 5 ccm einer gesättigten Na-Acetatlösung und mit 5 ccm 20%iger Natriumcarbonatlösung schwach alkalisiert. Die Lösung wurde mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt. Die stufenphotometrische Messung geschah mit Filter S 61. Die in den aufgeführten Versuchen erhaltenen Werte sind folgende:

	Cystin mg	K berechnet auf 100 ccm
A	1 mg	0,25212
B	2 mg	0,53970
C	3 mg	0,74852

Es wurde also eine annähernde Proportionalität zwischen angewandter Cystinmenge und dem gefundenen Extinktionskoeffizienten erzielt. Jedoch muß bemerkt werden, daß bei häufigeren Wiederholungen nicht immer eine befriedigende Übereinstimmung mit den obigen Werten erreicht werden konnte. Die Resultate konnten auch nicht durch Variation der NaCN-Werte und des Ammoniaks verbessert werden. Aus diesem

Grunde erscheint diese Methode für die Cystinbestimmung als unzuverlässig. Ich habe trotzdem an einigen Zusatzversuchen mit Harn die Fehlergröße dieser Methode zu bestimmen gesucht.

Einer abgemessenen Menge Harn wurde eine bestimmte Cystinmenge zugesetzt; mit einem Teil dieses künstlichen Cystinharns wurde die Reduktionswirkung auf Phosphormolybdänsäure direkt bestimmt (a) und in einem aliquoten Teil wurde die Reduktion nach Einwirkung des NaCN, d. h. nach Überführung des zugesetzten Cystins in Cystein bestimmt. Die Differenz der Extinktionskoeffizienten von b und a ergibt den Extinktionskoeffizienten für die gefundene Menge Cystin. Unter Zugrundelegung eines Extinktionskoeffizienten von 0,18, wie er sich als Mittelwert bei mehreren Versuchen mit reiner Cystinlösung für 1 mg Cystin in 100 ccm ergab, wurden in den Zusatzversuchen folgende Resultate erhalten.

	Zuges. Cystin mg	Wiedergef. Cystin mg	% des zuges. Cystins wiedergefunden
1.	1,0	0,956	95,6
2.	1,0	1,05	105,0
3.	0,5	0,4	80,0
4.	1,0	0,802	80,2
5.	1,0	1,04	104,0

Es sind also erhebliche Schwankungen zu beobachten; die wiedergefundene Cystinmenge liegt in diesen Versuchen zwischen 80,0—105 % der dem Harn zugesetzten Menge. Wenn es sich um mehr orientierende Untersuchungen handelt, bei denen diese Schwankungsbreite in Kauf genommen werden kann, so kann diese Methode wegen ihrer einfachen Ausführung empfohlen werden. Im Nachstehenden habe ich eine genauere Cystin-Bestimmungsmethode beschrieben; es sei hier jedoch die Arbeitsweise der „Cyanidmethode" kurz zusammengefaßt wiedergegeben, da diese der nachstehend beschriebenen Methode an Einfachheit überlegen ist.

Versuchsanordnung bei der Cyanidmethode.

a) 2 ccm Urin
——
2 ccm NH_3 25 %

b) 2 ccm Urin
1 ccm NaCN 5 %
2 ccm NH_3 25 %

Beide Portionen werden 10 Minuten im kochenden Wasserbad erwärmt. Zu a) und b) werden 1 ccm HCl 25%, 2 ccm 5%ige Phosphormolybdänsäure, 5 ccm gesättigte Natriumacetatlösung und 5 ccm 20%ige Na_2CO_3–Lösung hinzugegeben. Beide graduierten Reagenzgläser werden mit destilliertem Wasser auf 50 ccm aufgefüllt. Wenn klare Blaufärbung auftritt, wird am Stufenphotometer sofort die Lichtabsorption gegen Wasser bestimmt.

Durchschnittsablesung D/3 cm S 61:

a)	b)
28,15	29,9
K = 0,43950	K = 0,47650

Differenz der Extinktionskoeffizienten von b) – a):

$$\begin{array}{rr} & 0{,}47650 \\ - & 0{,}43950 \\ \hline = & 0{,}03700 \end{array}$$

Diese Differenz der Koeffizienten entspricht dem Cystin, das in dem Nativ-Urin enthalten war. Wenn man, wie oben, einen K von 0,18 für 1 mg Cystin in 100 ccm zu Grunde legt (also 0,36 in 50 ccm) erhält man bei der Auffüllung auf 50 in 2 ccm Urin nach folgender Berechnung 0,037:0,36 = 0,103 mg Cystin. 100 ccm des untersuchten Urins enthalten also 50 × 0,103 = 5,15 mg Cystin.

Die Reduktion des Cystins in saurer Lösung durch Schwermetalle ist bekannt und zur Darstellung des Cysteins vielfach verwendet worden. Namentlich wird hier Zink angewandt. Der mit Zink in saurer Lösung entstehende (nascierende) Wasserstoff vermag Cystin zu Cystein zu reduzieren.

$$\underset{\text{Cystin}}{-\,S.S.} + H_2 = \underset{\text{Cystein}}{2\text{–}SH}$$

Die auf diese Weise vor sich gehende Reduktion des Cystins erfolgt jedoch nicht quantitativ zu Cystein; es entstehen neben dem letzteren noch andere Reduktionsprodukte, die unregelmässige Werte verursachen.

Wird jedoch Zink in alkalischer Lösung statt in saurer angewandt, so werden nach meinen Befunden befriedigende

Ergebnisse erzielt. Die Entwicklung von Wasserstoff erfolgt unter Zinkatbildung nach folgender Gleichung:

$$Zn + 2\ NaOH = Zn\ (CNa)\ 2 + H_2$$

Der entstehende Wasserstoff reduziert dann weiter wie oben Cystin zu Cystein.

Nach meinen Versuchen erfolgt die Cystinreduktion in alkalischer Lösung mittels Zink quantitativ zu Cystein. Beim stufenphotometrischen Vergleich der Lösung mit äquivalenten Cystinmengen einerseits und Cystein andererseits, erscheinen die ersteren allerdings etwas stärker gefärbt, was wahrscheinlich auf geringe Verunreinigungen des verwendeten Cysteinpräparates hinweist.

Es waren zunächst noch einige Vorversuche notwendig, um die Bedingungen für eine quantitative Cystinbestimmung auf der Grundlage der Reduktion mit Zink in alkalischer Lösung zu ermitteln. Folgende Faktoren waren es vor allem, deren Einfluß auf die Bestimmung untersucht werden mußten:

1. Die anzuwendende Zinkmenge.
2. Die Reduktionszeit.
3. Der Alkalitätsgrad der Lösung.

1. Die folgenden Zahlen geben über den Einfluß der Zinkmenge Aufschluß. Unter Konstanthaltung aller übrigen Bedingungen wurde die Menge des zugesetzten Zinks variiert; die Herstellung der Farblösung für die stufenphotometrische Messung erfolgte nach den weiter unten angegebenen Vorschriften.

Zink	D/3 cm S 61
0,05 g	0,2737
0,10 g	0,2739
0,20 g	0,2777

Aus dieser Aufstellung geht hervor, daß die Zinkmenge in diesen Grenzen von keinem nennenswerten Einfluß auf die Cystinreduktion ist. In den weiteren Versuchen wurde deshalb nicht mehr besonders auf den Zinkzusatz Rücksicht genommen; es wurde für jeden Versuch immer etwa eine Messerspitze feingepulvertes Zink verwendet.

2. Zeiteinfluß. Als Einwirkungszeit wurde die Dauer der Zinkeinwirkung auf die Cystinlösung bezeichnet.

Einwirkungszeit	D/3 cm S 61
5 Minuten	0,2625
10 „	0,2745
20 „	0,2938
30 „	0,2830

Eine Reduktionsdauer von 20 Minuten ergibt also den größten Wert für den negativen Logarithmus der Lichtdurchlässigkeit der reduzierten Lösung; nach dieser Zeit wird also die größte Cystinmenge wiedergefunden. Der kleine Abfall bei 30 Minuten ist vermutlich auf die Alkalieinwirkung auf das Cystein zurückzuführen. Die optimale Reduktionszeit beträgt demnach 20 Minuten, die in den weiteren Versuchen eingehalten wurde.

3. Einfluß der Alkalität. Je 1 ccm 0,1 %ige Cystinlösung wurde (a) mit 2,5 ccm 2–n NaOH und (b) mit 2,5 ccm 25 %ige NaOH versetzt und gleichmäßig weiter behandelt.

D/3 cm (Filter S 61)	
a)	b)
0,2758	0,2740

Es besteht hiernach kein bedeutender Einfluß des Alkalitätsgrades auf die Cystinreduktion; trotzdem wurde in allen folgenden Versuchen 25 %ige NaOH verwendet, da die Spontanoxydation des Cysteins in alkalischer Lösung durch größere Alkalimengen stark gehemmt wird.

Nach diesen Versuchen war die nächste Aufgabe die Ermittlung einer Eichkurve mit Hilfe bekannter Cystinkonzentrationen. Bei Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes genügt ein einzelner Eichwert, um daraus alle andern Konzentrationen zu errechnen. Die Anwendbarkeit dieses Geesetzes war für den vorliegenden Fall noch zu prüfen.

Versuchsanordnung: Eine abgemessene Menge (2 ccm) einer 0,2 %igen Cystinlösung wird in einem spitz-auslaufenden Zentrifugenglas mit 1,5 ccm H_2O und 2,5 ccm 25 %ige NaOH versetzt und nach Zugabe einer Messerspitze pulverförmigen

Zinks 20 Minuten stehen gelassen. Während dieser Zeit wird das Zink wiederholt mit einem kurzen Glasstäbchen, das kurz genug ist, um beim Zentrifugieren in dem Gläschen bleiben zu können, aufgewirbelt. Darauf wird 5 Minuten scharf zentrifugiert. Von der klaren, überstehenden Flüssigkeit werden 2 ccm in ein 50 ccm–Meßkölbchen pipetiert. In das Meßkölbchen sind vorher 5 ccm 2–n HCl gegeben worden, um die alkalische Cysteinlösung bei Abwesenheit von Zink nicht unnötig dem Luftsauerstoff auszusetzen. In das Kölbchen werden weiterhin 4 ccm 5%ige Phosphormolybdänsäure und 4 ccm einer gesättigten Na-Acetat-Lösung gegeben. Je nach der vorhandenen Menge Cystin (bezw. Cystein) entsteht eine mehr oder weniger intensive Blaufärbung. Nach 3 Minuten stehenlassen wird auf 50 ccm aufgefüllt und photometriert. Wenn die Farblösung nicht zu intensiv gefärbt ist, wird zweckmäßig zur Messung eine Schichtdicke von 3 cm gewählt. Die Ablesungen wurden mit Filter S 61 vorgenommen.

Nach dieser Arbeitsweise habe ich mit reinen Cystinlösungen eine große Anzahl Bestimmungen vorgenommen. Aus den Protokollen seien folgende Ergebnisse wiedergegeben, die zugleich als Eichwerte dienen und die Anwendbarkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes für den vorliegenden Fall demonstrieren sollen. Die Werte für D stellen Mittelwerte aus einer Reihe von Bestimmungen dar, die unter einander gute Übereinstimmung zeigten. Die Zahlen für D sind auf ein Volumen der Endlösung von 50 ccm bezogen. Es wurde Filter S 61 verwendet.

Versuchs-nummer	mg Cystin	D/3 cm gef.	D/3 cm ber.
1	0,333	0,21	—
2	0,50	0,32	0,318
3	0,667	0,428	0,420
4	0,833	0,540	0,525
5	1,0	0,638	0,630

Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse (Fig. 1), bei der die D-Werte auf die Abszisse und die zugehörigen Cystinkonzentrationen in mg auf die Ordinate eines rechtwinkligen Koordinatensystems abgetragen sind, ergibt eine Gerade durch den Nullpunkt. Die gefundenen Extinktionskoeffizienten sind also proportional den angewandten Cystinkonzentrationen.

Hiermit ist die Möglichkeit der kolorimetrischen Bestimmung des Cystins in reinen Lösungen mit befriedigender Genauigkeit gegeben. Die Reduktion von Cystin mit Zink in alkalischer Lösung liefert zuverlässige Werte.

Die hier ausgearbeitete Methodik der Cystinbestimmung wurde nunmehr auf den Harn angewandt. Hierbei ergab sich jedoch eine Reihe von Schwierigkeiten, die es nicht gestatteten, die beschriebene Methode ohne weiteres auf den Harn zu übertragen.

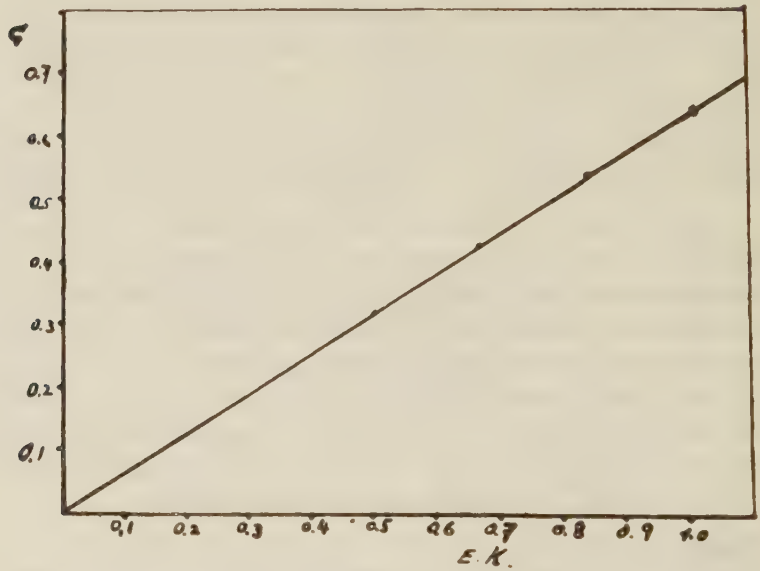

Fig. 1

Wird eine Probe nativen Harns mit Natronlauge und Zink behandelt, so nimmt die Reduktionswirkung des so behandelten Harns, erkennbar an der Blaufärbung mit Phosphormolybdänsäure gegenüber der unbehandelten Harnprobe ab. Auch wenn dem Harn eine geringe Menge Cystin zugesetzt wird, ist die erzielte Blaufärbung im Verhältnis zum nativen Harn geringer. Wir müßten, wenn keine Einwirkung des Alkalis und Zink auf den Harn besteht, eine der im Harn vorhandenen bezw. zugesetzten Cystinmenge proportionale Farbvertiefung wahrnehmen. Da dies nicht zutrifft, im Gegenteil sogar eine Abnahme der Farbintensität des behandelten Harns wahrzunehmen ist, kann die Cystinbestimmung im Harn nicht auf diese einfache Weise erfolgen, wie wir sie bei reinen Cystinlösungen kennen gelernt hatten.

Die Ursache der erwähnten Erscheinung der Abnahme der Reduktionswirkung von Harn, der mit Zink in alkalischer Lösung zusammengebracht wurde, ist in einer Umwandlung der im Urin normaler Weise vorhandenen reduzierenden Substanzen zu suchen. Zunächst war hier die Harnsäure in Betracht zu ziehen. Angestellte Versuche zeigten jedoch, daß die Reduktionskraft der Harnsäure gegen Phosphormolybdänsäure durch Behandlung mit Zink und Alkali nicht geschwächt wird, so daß die Harnsäure für den Ausfall nicht in Betracht kommt. Als reduzierende Substanzen waren weiterhin besonders die Harnfarbstoffe in Betracht zu ziehen. Erfahrungsgemäß haben wir es bei den Farbstoffkomponenten des Harns im Wesentlichen mit Stoffen von chemisch labilem Charakter zu tun; von vornherein konnte daher angenommen werden, daß die Harnfarbstoffe durch die Zink-Alkalibehandlung in irgendeiner Weise umgewandelt werden, so daß sie für die Reduktionsprobe mit Phosphormolybdänsäure nicht mehr in Frage kommen. Diese Annahme wurde durch die folgenden Versuche bestätigt. Der größte Teil der Harnfarbstoffe kann durch Absorption an Tierkohle aus dem Harn entfernt werden. Eine Probe wurde daher mit Tierkohle kräftig geschüttelt und darnach filtriert. Einem aliquoten Teil des schwach-gelb gefärbten Filtrats wurde Zink und NaOH zugesetzt und — wie bei der reinen Cystinlösung beschrieben — weiterbehandelt. Nach Anstellen der Reduktionsprobe ergab ein Vergleich der nativen Harnprobe mit der durch Kohle entfärbten gleiche Farbintensität der beiden Proben. Durch Tierkohle konnte also aus dem Harn die „störende" Substanz entfernt werden. Hiermit war aber für die Cystinbestimmung kein wesentlicher Fortschritt erzielt, da weitere Versuche ergaben, daß das dem Harn zugesetzte Cystin auf diese Weise nicht quantitativ wiedergefunden wurde. Der Cystinverlust erklärt sich einerseits durch eine Absorption des Cystins an Tierkohle, andererseits durch eine katalytisch bedingte Oxydation des absorbierten Cystins. Diese Verhältnisse konnten auch nicht wesentlich günstiger gestaltet werden, wenn dem Harn durch Säure- oder Alkalizusatz wechselnde Reaktion erteilt wurde.

Nach mannigfachen Versuchen in verschiedenen Richtungen bin ich dazu übergegangen, die Harnfarbstoffe durch eine Extraktion mit Alkohol aus dem Harn zu entfernen. In 96 %igem Alkohol erwies sich das Cystin als unlöslich. Der von

den Farbstoffen befreite Harnrückstand, der das Cystin quantitativ enthält, kann darum zur Bestimmung nach der Zink-NaOH-Reduktion benützt werden.

In den ersten Versuchen wurden wiederum zunächst zur Erprobung der Methode rein-wässerige Cystinlösungen benützt, wobei nach Alkoholbehandlung des Abdampfrückstandes, Filtration, Lösung des Rückstandes in H_2SO_4 usw. (siehe unten) die angewandte Cystinmenge quantitativ wiedergefunden wurde. Die anschließenden Zusatzversuche mit Harn hatten ebenfalls ein befriedigendes Ergebnis. Dem Harn wurde eine bestimmte Menge Cystin zugesetzt und nach der unten genauer angegebenen Arbeitsweise behandelt. Ein aliquoter Teil des mit Alkohol extrahierten und in H_2SO_4 gelösten Rückstandes wurde mit Zink und NaOH versetzt zur Reduktion des Cystins, während ein anderer aliquoter Teil direkt für die Herstellung der Farblösung mit Phosphormolybdänsäure verwendet wurde. Diese letztere Lösung ergab die durch die noch im Rückstand verbleibenden reduzierenden Substanzen verursachte (meist ganz schwache) Färbung, die von der Farbintensität der ersten Probe (in der das Cystin in Cystein überführt wurde) in Abzug gebracht wurde. Die folgende Tabelle enthält die Ergebnisse dieser Zusatzversuche.

Versuchs-nummer	Datum	Zusatz mg	gefunden mg	%
1	6. 3. 32	0,33	0,37	112
2	8. 3. 32	0,33	0,31	94
3	30. 3. 32	0,22	0,238	108
4	4. 4. 32	0,266	0,280	103
5	25. 4. 32	0,266	0,282	103
6	17. 5. 32	0,266	0,277	102
7	25. 4. 32	0,203	0,183	92
8	26. 4. 32	0,266	0,245	92
9	18. 5. 32	0,266	0,268	100,7
10	18. 5. 32	0,266	0,281	103

Als Durchschnitt wurde in diesen Versuchen rund 101 % der dem Harn zugesetzten Cystinmenge wieder gefunden. Hierbei ist zu bedenken, daß der normale Harn nach meinen unten aufgeführten Untersuchungen selbst wechselnde Quantitäten Cystin enthält, die nicht in Anrechnung gebracht wurden, woraus sich der im Durchschnitt etwas höhere Wert zum Teil erklärt.

Für die Cystinbestimmung im Harn kann nunmehr folgende Methode angegeben werden.

50 ccm Urin werden in einer Glasschale auf dem Wasserbade vorsichtig eingedampft. Der Rückstand wird 4 mal mit je 5 ccm 96%igem Alkohol mittels eines Glasstabes verrieben und die überstehende alkoholische Lösung jedes Mal durch ein quantitatives Filter filtriert. Das letzte Filtrat muß farblos ablaufen. Der Rückstand in der Schale wird unter leichtem Erwärmen in $^1/_{10}$ –n H_2SO_4 gelöst und die Lösung durch das gleiche Filter filtriert. Das Auswaschen der Schale und des Filters wird mehrmals wiederholt. Die Filtrate, die das gesamte Cystin gelöst enthalten, werden in einem 25 ccm-Meßkölbchen aufgefangen und zum Schluß mit Wasser auf 25 ccm ergänzt. Für die Cystinbestimmung (a) und für die Bestimmung der „Eigenreduktion" dieser Lösung (b) werden je 2 ccm in ein Zentrifugengläschen pipetiert. Die Weiterbehandlung der beiden Proben ergibt sich aus folgendem Schema:

a)	2 ccm Filtrat	b)	2 ccm Filtrat
	1,5 ccm H_2O		1,5 ccm H_2O
	2,5 ccm NaOH 25%ig		2,5 ccm NaOH 25%ig
	Zinkstaub		—
	15 Min. stehen lassen		15 Min. stehen lassen
	5 Min. zentrifugieren		5 Min. zentrifugieren

In zwei 25 ccm-Kölbchen werden je 5 ccm 2–n HCl gegeben und dazu 2 ccm von den obigen zentrifugierten Lösungen. Darauf werden 4 ccm 5%ige Phosphormolybdänsäure und 4 ccm gesättigte Natriumacetat-Lösung hinzugesetzt. Es entwickelt sich eine blaue Farbe. Nach 2 Minuten Stehenlassen wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt, umgeschüttelt und die Farblösungen photometriert.

Berechnung: Die mit Zink behandelte Probe (a) ergibt Cystin und andere reduzierende Substanzen, Probe (b) dagegen nur die letzteren. Die Differenz der für (a) und (b) ermittelten Extinktionskoeffizienten (K) bezw. negativen Logarithmen der Lichtdurchlässigkeit (D) für eine bestimmte Schichtdicke ergibt K, bezw. D, die den gefundenen Cystinmengen entsprechen. Unter Zugrundelegung des in den vorstehenden Versuchen mit reinen Cystinlösungen ermittelten Extinktionskoeffizienten für 1 mg Cystin in 50 ccm von 0,6383 ergibt sich die Umrechnung auf den

Cystingehalt des Harns in einfacher Weise, da die Extinktionskoeffizienten den Cystinkonzentrationen direkt proportional sind. Es wurde von der Endlösung eine Menge angewandt, die gewöhnlich $^2/_3$ ccm ursprünglichem Harn entspricht; es hat daher noch Umrechnung auf 100 ccm bezw. auf die Tagesmenge Harn zu erfolgen. Beispiel: 100 ccm Urin, Eindampfungsrückstand mit H_2SO_4 und H_2O aufgenommen ad 50 ccm, davon 2 ccm (=4 ccm Harn) im Zentrifugenglas ad 6 ccm, davon 2 ccm (=1,33 ccm Harn) ad 25 ccm zur stufenphotometrischen Ablesung.

	a)	b)
Ablesung:	59,08	72,5
K/50 ccm:	0,1133	0,0698

Differenz der K-Werte von a) und b) = 0,0445.

Der für 1 mg Cystin/50 ccm ermittelte Extinktionskoeffizient (S. 15) ist K=0,638. Es ist daher: 0,638 : 0,0445 = 1,0 : X · X= 0,0697 mg Cystin in 1,33 ccm Harn. Umrechnung auf 100 ccm Urin, bezw. auf Tagesmenge, erfolgt dann in einfacher Weise: $\frac{0{,}0697 \cdot 100}{1{,}33}$ = 5,24 mg % Cystin.

Ich habe nun diese Methode für die Cystinbestimmung in 10 verschiedenen Harnproben angewandt, einmal, um eine orientierende Vorstellung über die normale Cystinausscheidung, und dann, um über die Cystinausscheidung in einigen pathologischen Fällen Aufschluß zu erhalten. Die pathologischen Harne wurden mir in verdankenswerter Weise vom hiesigen Bürgerspital zur Verfügung gestellt. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die erhaltenen Resultate.

Name	Diagnose	Tagesurinmenge ccm	mg %	Tagescystinmenge g
1. Mathys	Lebercirrhose	—	6,6	—
2. B. T.	gesund	1700	3,8	0,064
3. M. T.	gesund	1700	11,3	0,193
4. J. B.	Nephritis	2100	5,4	0,1
5. W. T.	gesund	2000	11,3	0,224
6. Jenny	Diabetes	500	40,0	0,2
7. M. T.	gesund	1700	12,6	0,214
8. G. C.	gesund	2000	6,3	0,126
9. M. T.	gesund	1950	7,6	0,152
10. H. P.	gesund	1200	10,68	0,128

Meine hier aufgeführten Untersuchungen können keineswegs eine befriedigende Auskunft über das Vorkommen von Cystin in Harnen von verschiedener Herkunft geben. Dazu ist eine ausgedehntere Reihe von Untersuchungen notwendig. Aber sie zeigen einmal die Anwendbarkeit der Methode für die Cystinbestimmungen in nativen Harnen. Weiter erlauben sie immerhin, über die Cystinausscheidung eine vielleicht willkommene, vorläufige Orientierung zu geben, da trotz zahlreicher Untersuchungen über die Schwefelverbindungen des Harnes, insbesondere über die Cystinurie, bisher wenige Zahlenangaben existieren.

Die in den Versuchen 3, 7 und 9 aufgeführten Cystinbefunde im Harn ein und derselben gesunden Versuchsperson fallen wegen ihrer Höhe auf. Ebenso das Ergebnis in Versuch 5, in dem es sich um ein Familienmitglied der Versuchsperson der Versuche 3, 7 und 9 handelt. Es ist ja bekannt, daß die Cystinurie vielfach familiär bedingt ist. Wahrscheinlich trifft diese familiäre Bedingtheit der Cystinausscheidung auch in den genannten von mir untersuchten Fällen zu. Die Untersuchungen über die Cystinausscheidung in pathologischen Harnen ermöglichen vorerst keine Schlüsse auf die zu Grunde liegende Krankheit zu ziehen. Zu diesem Zwecke wäre die normalerweise ausgeschiedene Cystinmenge in Serienversuchen zunächst noch sicher zu stellen. Die von mir in den untersuchten Fällen gefundenen Cystinwerte von 3 8–12,6 mg % bezw. 0,064–0,224 g auf die Tagesmenge berechnet, liegen im Ganzen in den Grenzen der eingangs erwähnten Befunde von Abderhalden.

Zusammenfassung.

Die hier aufgeführten Versuche ergeben also eine brauchbare Methode zur quantitativen Bestimmung des Cystins im Urin. Es wurden zwei Methoden ausgearbeitet, denen die Überführung des Cystins in Cystein und die durch das letztere erzielte Blaufärbung mit Phosphormolybdänsäure zu Grunde liegt.

Die Reduktion des Cystins wurde erstens mit Natrium-Cyanid, zweitens mit Zink in alkalischer Lösung durchgeführt. Die Reduktion des Cystins zu Cystein auf dem zweiten Wege

lieferte zuverlässigere Resultate und wurde deshalb für die Cystinbestimmung genau ausgearbeitet und bei verschiedenen Urinen angewandt. Die hierbei erzielten Ergebnisse sowie die methodischen Einzelheiten sind in dem Vorstehenden wiedergegeben.

Diese Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. Spiro unternommen. Es ist mir eine angenehme Pflicht, die großzügige Förderung meiner Arbeit durch die zahlreichen Ratschläge meines hochverehrten Lehrers an dieser Stelle besonders hervorzuheben. In gleicher Weise danke ich Herrn Prof. Gerlach für die Liebenswürdigkeit, meine Arbeit der Fakultät vorzulegen.

Literaturverzeichnis.

1. K. A. H. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chemie 34, 207 (1902).
2. Sullivan, zit. und E. J. Cohn, Erg. d. Physiol. Bd. 33 S. 862.
3. K. Spiro, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten 113, 39; (1931).
4. J. H. Müller, Journal biol. Chem. 56, 157; 58, 373; (1923).
5. S. Velake, Bioch. Zeitschr. 161, 446; (1925).
6. vgl. G. Zemplén, in Abderhalden, Bioch. Handlex. Bd. 4 S. 653.
7. G. v. Bergmann, Beiträge z. chem. Physiologie und Pathologie 4, 192; (1903).

7a. H. D. Dakin, Journal biol. Chem. 14, 321; (1914).

8. E. Földes, Zeitschr. f. Exp. Med. 60, 371: (1928).
9. F. G. Hopkins, Biochem. Journal 15, 286; (1921).
   F. G. Hopkins und M. Discon, Journal biol. Chem. 54, 527; (1922).
10. T. Thurnberg, Sk. Arch. Physiol. 40, 1; (1920).
11. O. Meyerhof, Pflügers Arch., 199, 531; (1923).
12. W. Grassmann, H. Dyckerhoff & O. v. Schönebeck, Zeitschr. f. physiol. Chemie 186, 183, (1930),
13. C. Moncorps, Arch. exp. Pharm Path. 141, 67; (1929).
14. C. Vögtlin, Journal of pharmacol. exp. Therapeut. 25, 297; (1925).
15. R. Labes, Arch. path. Pharm. 141, 148 (1929).
16. J. M. Looney, H. Berglund und R. C. Graves, Journal biol. Chem. 57, 1515; (1923).
17. E. Abderhalden, Lehrbuch der physiol Chemie, 6. Aufl. Anm. S. 381.
18. A. Magnus-Levy, Biochem. Zeitschr. 541, (1907).
19. H. B. Lewis und L. E. Root, Journal biol. Chem. 1, 303; (1922).
    H. B. Lewis, H. Updegraff und D. Mc. Ginby, Journal biol. Chem. 54; (1924).
20. E. Abderhalden, Zeitschr. f. phsiol. Chemie 38, 559; (1903).
21. A. Loewy und C. Neuberg, Zeitschr. physiol. Chem. 43, 338; (1904).
22. L. v. Udránszky und E. Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 77; (1891).
23. Gabbe, Zeitschr. f. exp. Med. 24.
24. J. Kühnau, Biochem. Zeitschr. 230, 353; (1931).
25. Bach & Bach, Biochem. Zeitschr. 236, 174; (1931).
26. L. v. Udránszky und E. Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 564; (1889).
27. B. Mester, Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, 113; (1889).
28. J. F. Gaskell, Journal of physiol. 36, 142; (1907) zit. nach Neubauer-Huppert, Analyse des Harns I S. 629.
29. Looney, Journal of biol. Chem. 54, 171; (1922).
30. C. Pulfrich, Zeitschr. f. Instrumentenkunde 45, 35; 61, 105; (1925).